

# Konstruksi dan Transformasi Gen *OsERA1* ke Vektor Ekspresi serta Respon Tanaman Padi Transgenik Nipponbare-*OsERA1* terhadap Cekaman Kekeringan

## (Construction and Transformation of *OsERA1* Gene into Expression Vector and Response of Nipponbare-*OsERA1* Transgenic Rice to Drought Stress)

Tri J. Santoso\*, Aniversari Apriana, Atmitri Sisharmini, dan Kurniawan R. Trijatmiko

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia  
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; \*E-mail: trijsant@yahoo.com

Diajukan: 10 Maret 2018; Direvisi: 27 Mei 2018; Diterima: 25 Juni 2018

### ABSTRACT

Drought stress is a major constrain which could influence rice productivity. *Enhanced Response to ABA1 (ERA1)* gene encoding a  $\beta$ -subunit farnesyltransferase enzyme plays a role to control sensitivity of the guard cells to abscisic acid (ABA), hence regulating drought stress response in plant species including rice. This study aimed to clone the *OsERA1* gene into expression vector, introduce it into rice plant, and confirm the positive *OsERA1*-rice plants conferring drought tolerance. This study was initiated by isolation of the *OsERA1* gene from rice cDNAs and cloned it to an expression vector cassette, pCambia1301. The cassette harboring *OsERA1* gene was introduced into rice plant cv. Nipponbare mediated by *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404. Putative transgenic lines were detected using PCR and Southern blot analyses to confirm the inserted transgene and the positive lines were assayed their tolerance to drought. The *OsERA1* gene was successfully isolated and constructed into expression vector to generate pCambia1301-*OsERA1*. Introduction of the gene into Nipponbare has produced nine putative transgenic rice lines, of which, six lines harbored *OsERA1* gene. Southern blot analysis of sixteen T<sub>2</sub> plants from two PCR-positive transgenic lines revealed 1–3 copies of transgene were integrated into rice genome of transgenic lines. Five transgenic lines of Nipponbare-*OsERA1* showed better response to drought at vegetative phase compared to control in term of recovery ability. At generative phase, the five transgenic lines yielded less unfilled grains compared to control. Overall, the transgenic lines obtained from this study could be potential candidates for developing rice varieties tolerant to drought.

**Keywords:** Rice, *Oryza sativa* L., gene cloning, *OsERA1*, drought tolerance.

### ABSTRAK

Cekaman kekeringan merupakan kendala utama yang dapat memengaruhi produktivitas padi. Gen *Enhanced Response to ABA1 (ERA1)* yang menyandikan enzim  $\beta$ -subunit farnesyltransferase berperan dalam meningkatkan sensitivitas sel penjaga terhadap asam absisat (ABA) sehingga mengatur respon cekaman kekeringan pada tanaman termasuk padi. Tujuan penelitian ini adalah melakukan kloning gen *OsERA1*, mengintroduksikannya ke dalam genom padi, dan mengonfirmasi toleransi tanaman yang positif mengandung gen *OsERA1* terhadap kekeringan. Penelitian diawali dengan isolasi gen *OsERA1* dari cDNA padi dan konstruksi ke dalam kaset vektor ekspresi pCambia1301, kemudian introduksi ke dalam genom tanaman padi cv. Nipponbare menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404. Gen sisipan pada galur-galur transgenik putatif Nipponbare-*OsERA1* dideteksi dengan analisis PCR dan *Southern blot*. Tanaman yang positif diuji toleransinya terhadap cekaman kekeringan. Hasilnya menunjukkan bahwa gen *OsERA1* berhasil diisolasi dan dikonstruksi untuk menghasilkan vektor kaset pCambia-*OsERA1*. Sebanyak sembilan galur padi transgenik putatif dihasilkan dan enam tanaman di antaranya positif membawa gen *OsERA1*. Dari analisis *Southern blot* terhadap enam belas tanaman dari dua galur transgenik positif PCR, terdapat 1–3 kopi transgen yang terintegrasi ke dalam genom galur padi transgenik. Lima galur padi transgenik Nipponbare-*OsERA1* generasi T<sub>1</sub> mempunyai respon toleransi yang lebih baik terhadap cekaman kekeringan pada fase vegetatif dalam hal kemampuan pulih setelah perlakuan kekeringan daripada tanaman kontrol Nipponbare. Pada fase generatif, lima galur generasi T<sub>2</sub> menghasilkan jumlah biji hampa lebih sedikit dibanding dengan kontrol. Galur transgenik hasil studi ini dapat menjadi kandidat potensial untuk pengembangan varietas padi toleran kekeringan.

**Kata kunci:** Padi, *Oryza sativa* L., kloning gen, *OsERA1*, toleran kekeringan.

## PENDAHULUAN

Kondisi iklim yang tidak menentu sebagai akibat pengaruh pemanasan global menyebabkan cekaman kekeringan yang dapat menurunkan hasil dan kualitas hasil padi secara signifikan (Tao et al. 2006). Kekeringan biasanya terjadi karena ketersediaan air tidak memenuhi kebutuhan fisiologis tanaman, proses evapotranspirasi terjadi secara berlebihan, atau gabungan dari keduanya. Salah satu strategi untuk mengatasi masalah tersebut adalah dengan merakit tanaman padi yang toleran terhadap kekeringan.

Pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan selain diatur oleh kondisi internal juga oleh kondisi lingkungan, di antaranya berupa respon terhadap hormon asam absisat (ABA). ABA merupakan fitohormon yang berperan dalam proses membuka dan menutupnya stomata untuk mengurangi kehilangan air saat terjadinya transpirasi. Hampir 90% tanaman kehilangan air karena proses transpirasi pada permukaan daun (Pei et al. 1998). Tanaman akan meningkatkan konsentrasi ABA pada kondisi kadar air tanah berkurang. Hormon tersebut akan meningkatkan sinyal *cascade* pada sel penjaga (*guard cell*) sehingga stomata menutup. Apabila kadar air dalam jaringan tanaman telah berada pada kondisi optimal, konsentrasi ABA menurun (Wang et al. 2005). Dengan demikian, kemampuan tanaman merespon ABA merupakan target penting pemulia tanaman untuk dapat meningkatkan toleransi tanaman pertanian terhadap cekaman kekeringan.

Beberapa gen telah diketahui peranannya untuk meningkatkan dan/atau menurunkan respon tanaman terhadap ABA, salah satunya adalah gen *Enhanced Response to ABA1* (*ERA1*). Gen ini berperan dalam meningkatkan sensitivitas sel penjaga pada stomata terhadap ABA. Gen *ERA1* pertama kali diisolasi dari tanaman *Arabidopsis thaliana*. Gen ini menyandikan subunit  $\beta$  dari enzim farnesyltransferase ( $\beta$ -subunit farnesyltransferase) yang berperan dalam respon tanaman terhadap ABA (Pei et al. 1998; Wang et al. 2005). Mutan gen *era1* menyebabkan terjadinya peningkatan dormansi biji dan penurunan respon terhadap ABA. Mutan *era1* menunjukkan adanya peningkatan toleransi tanaman terhadap cekaman kekeringan melalui pengurangan intensitas pembukaan stomata dan menurunnya tingkat kelayuan selama terjadinya cekaman kekeringan (Ziegelhoffer et al. 2000).

Enzim farnesyltransferase (FTase) telah diidentifikasi secara molekuler pada tomat, ercis/kacang polong (*pea*), dan *Arabidopsis* (Allen et al. 2002). Mutasi enzim ini pada mutan *era* menyebabkan

adanya respon hipersensitivitas terhadap ABA dan menutupnya stomata. Oleh karena itu, mutan *era1* disebut juga sebagai bentuk aplikasi dari inhibitor terhadap FTase (Pei et al. 1998). Beberapa famili mutan gen *ERA1* telah banyak diteliti. Cutler et al. (1996) dan Pei et al. (1998) melaporkan bahwa produk mutan gen *era1-1*, *era1-2*, dan *era1-3* menunjukkan pengaruh ABA terhadap peningkatan toleransi tanaman terhadap cekaman kekeringan. Pengaruh tersebut dapat berupa peningkatan dormansi biji, peningkatan aktivitas meristem, dan/atau menurunnya intensitas pembukaan stomata sehingga tingkat kelayuan daun menjadi berkurang pada saat cekaman kekeringan menimpa tanaman. Belakangan telah ditemukan pula seri mutan gen *era1* lainnya, di antaranya *era1-4*, *era1-5*, dan *era1-6* yang juga menunjukkan adanya peningkatan toleransi tanaman mutan terhadap cekaman kekeringan (Ziegelhoffer et al. 2000). Tujuan penelitian adalah melakukan kloning gen *OsERA1*, mengintroduksikannya ke dalam genom padi, dan mengonfirmasi toleransi tanaman yang positif mengandung gen *OsERA1* terhadap kekeringan.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di laboratorium dan rumah kaca Kelompok Peneliti Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Bogor.

Bahan yang digunakan untuk isolasi dan kloning kandidat gen *OsERA1* adalah tanaman padi varietas Inpari 1 dan Nipponbare serta plasmid vektor ekspresi pCambia1301. Untuk transformasi genetik dengan konstruk gen *OsERA1*, eksplan yang digunakan adalah embrio muda (*immature embryo*) padi cv. Nipponbare.

### Konstruksi Gen *OsERA1* ke Vektor Ekspresi pCambia1301

#### Isolasi mRNA dan amplifikasi fragmen gen dengan teknik PCR

RNA total diisolasi dari jaringan daun tanaman padi menggunakan *RNeasy® Plant Mini Kit* (Qiagen). RNA yang diperoleh selanjutnya disintesis menjadi cDNA menggunakan kit *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* (Invitrogen).

Amplifikasi kandidat gen dilakukan dengan menggunakan primer spesifik untuk gen *ERA1* dan cDNA padi sebagai cetakan. Reaksi PCR dilakukan pada 20  $\mu$ l volume total mengandung bufer PCR 1 $\times$ , dNTPs 200  $\mu$ M masing-masing, 50 ng primer *forward* dan *reverse* masing-masing, 50 ng cDNA, dan 1 unit

Taq DNA polimerase. Tahapan PCR yang dilakukan adalah denaturasi awal pada 94°C selama 5 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus PCR yang terdiri atas tahap denaturasi DNA pada 94°C selama 30 detik, penempelan primer pada 55°C selama 30 detik, dan sintesis DNA pada 72°C selama 1 menit. Tahapan akhir adalah satu siklus sintesis DNA akhir yang dilakukan pada 72°C selama 7 menit. Produk PCR dipisahkan dengan elektroforesis gel agarosa, kemudian divisualisasi dengan pewarnaan etidium bromida dan didokumentasi dengan perangkat *ChemiDoc™ EQ System* (Bio-Rad).

#### **Elusi dan ligasi fragmen DNA pada Vektor *pGEM®-T Easy* serta transformasi ke *Escherichia coli* DH5α**

Fragmen DNA hasil amplifikasi PCR diambil dari gel agarosa, dipurifikasi menggunakan *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen), dan dielusi menggunakan 40 µl air steril. Fragmen DNA diligasikan dengan 1 µl vektor *pGEM®-T Easy* (50 ng/µl) dengan bantuan enzim T4 DNA ligase dan bufer ligasi 2×. Campuran hasil ligasi selanjutnya diinkubasi pada 4°C selama satu malam. Plasmid rekombinan hasil ligasi kemudian ditransformasi ke bakteri *Escherichia coli* DH5α dengan metode CaCl<sub>2</sub> (*heat shock*) menurut metode Sambrook et al. (1989). Transformasi bakteri dilakukan dengan menggunakan 100 µl sel kompeten segar (*E. coli* DH5α) yang ditambahkan dengan 10 µl plasmid hasil ligasi. Bakteri *E. coli* DH5α hasil transformasi disebar merata di atas media *Luria Bertani* (LB) padat yang mengandung antibiotik ampicilin 50 mg/ml dan diinkubasi pada 37°C selama 16 jam. Koloni bakteri yang terbentuk ditumbuhkan pada media LB cair yang mengandung ampicilin 50 mg/ml dan digoyang pada 37°C selama satu malam. Plasmid rekombinan diisolasi dari bakteri menurut metode Sambrook et al. (1989).

#### **Kloning gen *OsERA1* ke vektor pCambia1301**

Konstruksi gen diawali dengan amplifikasi gen target menggunakan cetakan cDNA yang diisolasi dari jaringan daun padi. Primer spesifik yang digunakan untuk mengamplifikasi gen *OsERA1* dirancang dari mRNA padi cv. Nipponbare (*Oryza sativa* ssp. *japonica* Os01g0737800) yang menyandikan protein β-subunit farnesyltransferase. Primer spesifik yang terdiri atas primer *forward* dan *reverse* mengapit sekuen DNA gen target berukuran 1.450 bp. Kloning gen *OsERA1* dilakukan dengan proses *digest* *pGEM-T/OsERA1* dan *pCambia1301* menggunakan dua enzim restriksi, yaitu *Bam*HI dan *Sal*I. Pemotongan dengan kedua enzim restriksi dilakukan dalam dua

tahap. Pada tahap pertama, kedua plasmid dipotong dengan enzim *Sal*I pada 37°C selama satu malam. Setelah itu, enzim *Sal*I diinaktivasi dengan menginkubasi campuran pada 65°C selama 10 menit. Pada tahap kedua, plasmid dipotong dengan enzim *Bam*HI dengan menambahkan bufer restriksi dan enzim restriksi *Bam*HI 20 u/µl, kemudian diinkubasi kembali pada 37°C selama 4–5 jam. Pengecekan hasil pemotongan dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa 1%. Fragmen gen *OsERA1* dan *pCambia1301* hasil pemotongan diambil dari gel, dipurifikasi menggunakan *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen), dan dielusi dengan air steril. Fragmen gen *OsERA1* kemudian diligasikan ke vektor biner *pCambia1301*. Hasil ligasi kemudian ditransformasi ke *E. coli* DH5α menurut metode Sambrook et al. (1989). Hasil transformasi berupa koloni-koloni tunggal bakteri transforman, diisolasi plasmidnya, dan diverifikasi dengan enzim restriksi dan sekuensing DNA. Sekuen DNA selanjutnya dianalisis homologinya dengan gen-gen yang ada di basis data *GenBank®* dengan bantuan program *BLASTn*.

#### **Introduksi Gen *OsERA1* ke dalam Genom Padi Model Nipponbare Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens***

Konstruksi gen *OsERA1* dalam bakteri *A. tumefaciens* strain LBA4404 ditransformasikan ke dalam genom padi cv. Nipponbare menggunakan metode Hiei dan Komari (2008) dan Ishizaki dan Kumashiro (2008) yang dimodifikasi. Tahapan transformasi, yaitu kulit biji padi Nipponbare yang belum masak dibuang, kemudian biji disterilisasi dengan alkohol 70% dan larutan pemutih. Embrio yang belum masak dipisahkan dari biji secara aseptik dan ditanam pada media kokultivasi. Selanjutnya, suspensi bakteri *Agrobacterium* yang telah disiapkan sebelumnya ditetaskan pada tiap-tiap embrio pada media tersebut. Embrio yang telah diinfeksi dengan bakteri selanjutnya diinkubasi pada kondisi gelap, 25°C selama 7 hari. Setelah tahap kokultivasi, tunas yang memanjang dibuang dari embrio dengan skalpel dan embrio dipindahkan ke media *resting* dan diinkubasi pada kondisi terang, 28°C selama 5 hari. Selanjutnya, embrio dipindahkan ke media seleksi (media NB dengan penambahan *casamino acid* 500 mg/l, *L-prolin* 500 mg/l, *glutamin* 300 mg/l, *manitol* 36 g/l, *maltosa* 20 g/l, *2,4-D* 1 mg/l, *NAA* 1 mg/l, *BAP* 0,2 mg/l, *higromisin* 30 mg/l, *gelrite* 5 g/l, pH 5,8) dan diinkubasi pada kondisi terang, 28°C selama 3 minggu. Kalus-kalus yang tahan terhadap agen seleksi *higromisin* dipindahkan ke media seleksi baru dan diinkubasi selama 10 hari.

Kalus-kalus yang tahan pada media seleksi dan menunjukkan tanda-tanda embriogenik dipindahkan ke media pre-regenerasi (media MS dengan penambahan maltosa 30 g/l, sorbitol 20 g/l, agarosa tipe I 10 g/l, kinetin 2 mg/l, NAA 5 mg/l, sefotaksim 250 mg/l, higromisin 30 mg/l, pH 5,8) dan diinkubasi pada kondisi terang, 28°C selama 10 hari. Kalus-kalus yang berproliferasi dengan spot-spot hijau dipindahkan ke media regenerasi (media MS dengan penambahan sukrosa 30 g/l, kinetin 2 mg/l, NAA 1 mg/l, higromisin 30 mg/l, *gelrite* 3 g/l, pH 5,8). Setelah 2 minggu, plantlet yang beregenerasi dipindahkan ke media perakaran (media MS dengan penambahan sukrosa 30 g/l, IBA 1 mg/l, *gelrite* 2 g/l, higromisin 30 mg/l, pH 5,8). Tanaman selanjutnya dipindahkan ke ember yang diisi media tanah yang dicampur kompos dengan perbandingan 1:1 dan dipelihara hingga dewasa dan menghasilkan biji.

#### **Analisis Molekuler Tanaman Transforman Padi Nipponbare-OsERA1**

##### **Isolasi DNA genomik**

DNA genomik total tanaman padi transgenik putatif generasi T<sub>0</sub> diisolasi dengan metode Dellaporta et al. (1983) yang telah dimodifikasi. Pelet DNA yang diperoleh dilarutkan dengan bufer TE 1× atau akuades steril. Kemurnian dan konsentrasi DNA diukur dengan *NanoDrop*<sup>™</sup> (Thermo Fisher Scientific). Konsentrasi DNA sampel diseragamkan menjadi 100 ng/μl.

##### **Analisis molekuler dengan teknik PCR**

DNA genomik tanaman transforman diamplifikasi dengan PCR menggunakan *DNA Engine Tetrad*<sup>®</sup> *Peltier Thermal Cycler* (Bio-Rad). Analisis PCR menggunakan primer spesifik *hygromycin phosphotransferase II* (*hptII*) yang mengamplifikasi bagian gen higromisin yang merupakan marka seleksi. Reaksi PCR menggunakan volume 20 μl yang terdiri atas 2 μl bufer PCR 10×, 1,2 μl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,6 μl dNTPs (10 μM), 1 μl primer *hptII forward* dan *reverse* 10 μM masing-masing, 0,2 μl Taq DNA polimerase (5 U/μl), dan 1 μl DNA cetakan (100 ng/μl). Program PCR yang digunakan sebanyak 30 siklus yang terdiri atas tahap predenaturasi pada 94°C selama 3 menit, denaturasi DNA pada 94°C selama 30 detik, penempelan primer pada 65°C selama 30 detik, dan pemanjangan primer pada 72°C selama 1 menit. Pemanjangan primer terakhir dilakukan pada 72°C selama 7 menit.

Deteksi transgen secara molekuler juga dilakukan menggunakan primer spesifik gen *OsERA1* yang dikombinasikan dengan primer promotor (kombinasi

pasangan primer 35S-F/*OsERA1*-R). PCR dilakukan dengan total volume reaksi 20 μl menggunakan program PCR sebanyak 35 siklus yang terdiri atas predenaturasi pada 95°C selama 3 menit, denaturasi pada 94°C selama 1 menit 30 detik, penempelan primer pada 55°C selama 1 menit 30 detik, dan pemanjangan DNA pada 72°C selama 2 menit. Pemanjangan primer terakhir dilakukan pada 72°C selama 10 menit dan inkubasi pada 15°C selama 15 menit.

Produk PCR dielektroforesis pada gel agarosa 1% dengan bufer Tris-asetat-EDTA (TAE) 1×. Pewarnaan gel dilakukan dengan menambahkan *GelRed*<sup>®</sup> (Biotium) pada *loading dye* yang akan dimasukkan ke dalam sumur gel bersama produk PCR. Pita DNA divisualisasi menggunakan *ChemiDoc*<sup>™</sup> *EQ System* (Bio-Rad). DNA plasmid pCambia1301 dan tanaman tipe liar masing-masing digunakan sebagai kontrol positif dan negatif.

##### **Analisis molekuler dengan hibridisasi Southern blot**

Analisis hibridisasi *Southern blot* bertujuan mengetahui adanya jumlah kopi transgen yang telah terintegrasi ke dalam galur-galur tanaman transgenik yang positif PCR. Hibridisasi *Southern blot* dilakukan dengan mengikuti metode Trijatmiko et al. (2016) menggunakan pelabelan *digoxigenin-11-dUTP* (DIG-11-dUTP). *Southern blot* terdiri atas beberapa tahap, yaitu pemotongan DNA menggunakan enzim restriksi *EcoRI*, pelabelan marker, transfer DNA ke membran *Hybond*<sup>®</sup>-N<sup>+</sup>, pelabelan pelacak (*probe*), hibridisasi membran dengan pelacak, dan deteksi sinyal menggunakan larutan *CDP-Star*<sup>®</sup>. Analisis *Southern blot* dilakukan menggunakan pelacak gen *hptII* yang merupakan salah satu elemen genetik yang berada pada T-DNA dari vektor plasmid pCambia1301-*OsERA1* bersamaan dengan gen target *OsERA1*.

#### **Pengujian Cekaman Kekeringan Padi Transgenik Nipponbare-OsERA1 pada Fase Vegetatif dan Generatif**

##### **Pengujian cekaman kekeringan pada fase vegetatif**

Pengujian cekaman kekeringan dilakukan pada tanaman transgenik Nipponbare-*OsERA1* generasi T<sub>1</sub> dan Nipponbare nontransgenik di rumah kaca mengikuti prosedur yang diuraikan oleh Oh et al. (2005). Benih padi transgenik Nipponbare-*OsERA1* dan Nipponbare nontransgenik didekambahkan pada cawan petri selama 7 hari. Benih padi Cabacu, IR20, dan Gajah Mungkur digunakan sebagai kontrol. Kecambah berumur 7 hari dipindahkan ke pot plastik berdiameter 12 cm yang diisi media tumbuh

(campuran tanah, pasir, dan pupuk kompos dengan perbandingan 1:1:1 seberat 350 g) dengan satu tanaman per pot. Penyiraman tanaman padi di pot dilakukan satu kali setiap hari dengan volume yang sama untuk setiap pot (50 ml). Padi yang berumur 4 minggu setelah pindah tanam diberi perlakuan cekaman kekeringan. Perlakuan cekaman kekeringan diberikan dengan cara menghentikan penyiraman sampai kontrol peka (Nipponbare) menunjukkan gejala layu dan dilakukan pengamatan pertama (daun menggulung pada fase vegetatif). Pengamatan selanjutnya dilakukan pada tanaman kontrol peka mati atau semua daun mengering. Setelah pengamatan selesai, pemulihan tanaman dilakukan dengan cara penyiraman. Pada tanaman yang masih tumbuh kemudian dilakukan penilaian pemulihan. Penilaian penggulungan dan pengeringan daun, serta pemulihan tanaman dilakukan berdasarkan skor pengamatan pada *Standard Evaluation System for Rice* (IRRI 1996).

#### Pengujian cekaman kekeringan pada fase generatif

Pengujian cekaman kekeringan pada fase generatif dilakukan pada lima galur transgenik Nipponbare-*OsERA* generasi  $T_2$ . Bibit padi Nipponbare transgenik dan kontrol yang berumur 1 bulan ditanam secara individual di ember yang berisi 8 kg tanah dan telah diairi dengan 4 l air. Penyiraman tanaman dilakukan satu kali sehari dengan volume yang sama untuk setiap ember. Pada saat memasuki fase berbunga, tanaman diberi perlakuan cekaman kekeringan. Perlakuan cekaman kekeringan dilakukan dengan cara menghentikan penyiraman selama 7 hari (Fischer et al. 2003). Setelah 7 hari, tanaman-tanaman padi transgenik Nipponbare-*OsERA1* dan kontrol diberi air kembali untuk melihat kemampuan pe-

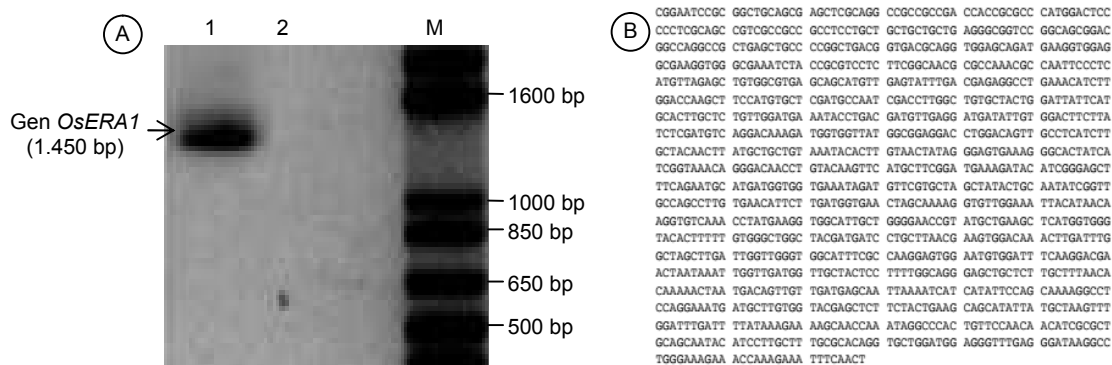
mulihan. Pengaruh perlakuan cekaman kekeringan terhadap hasil biji dievaluasi dengan menganalisis jumlah biji isi dan jumlah biji hampa pada padi Nipponbare transgenik dan kontrol.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

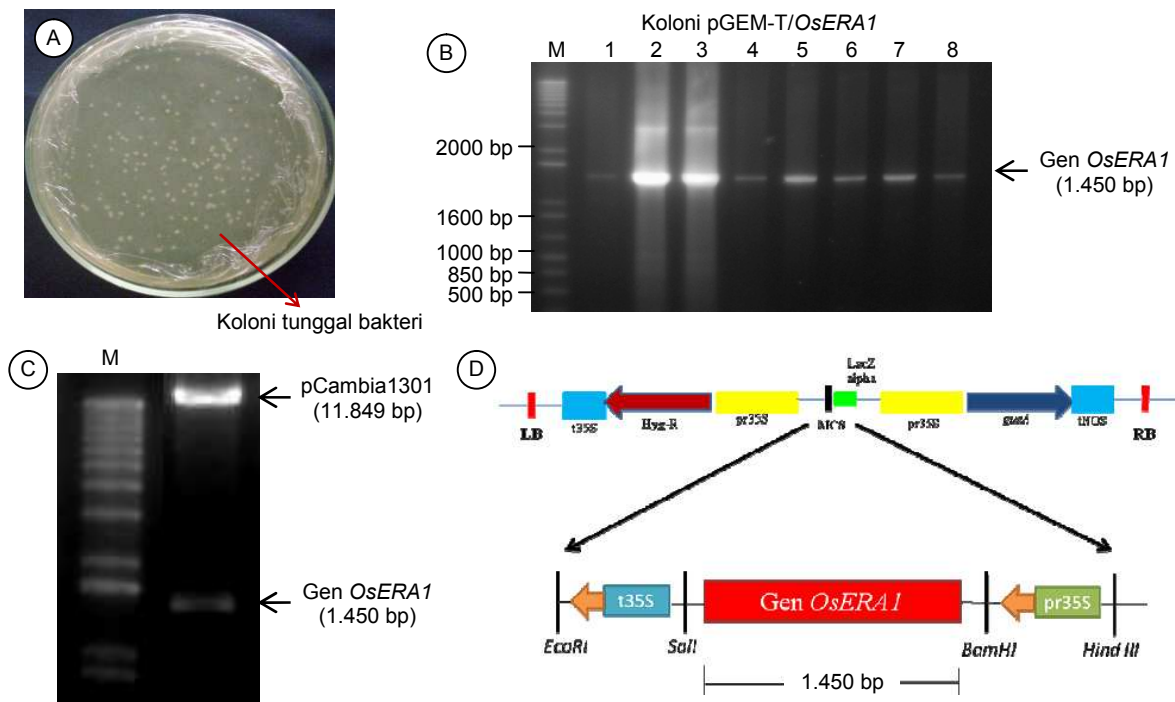
### Konstruksi Gen *OsERA1* ke Vektor Ekspresi pCambia1301

Amplifikasi kandidat gen *OsERA1* menghasilkan fragmen ampikon DNA berukuran sekitar 1.450 bp (Gambar 1A), sesuai dengan ukuran ampikon target dari primer. Amplifikasi PCR dengan cetakan cDNA padi Inpari 1 menghasilkan ampikon, sementara cetakan cDNA padi Nipponbare tidak menghasilkan ampikon (Gambar 1A). Untuk memastikan bahwa fragmen DNA produk PCR merupakan fragmen gen target, ampikon DNA 1.450 bp tersebut disekuensing dan menghasilkan urutan DNA 1.228 basa (Gambar 1B). Sekuen DNA tersebut mempunyai homologi tinggi (100%) dengan *O. sativa japonica group*, protein *farnesyltransferase subunit beta* (*LOC4327880*) atau gen *OsERA1*.

Keberhasilan transformasi bakteri dengan plasmid rekombinan diindikasikan dengan terbentuknya koloni-koloni tunggal bakteri. Transformasi bakteri dengan plasmid pGEM-T yang mengandung gen *OsERA1* menghasilkan koloni-koloni tunggal cukup banyak (Gambar 2A). Berdasarkan validasi menggunakan primer spesifik gen *OsERA1*, delapan koloni bakteri positif menghasilkan pita DNA yang berukuran 1.450 bp (Gambar 2B). Hal ini berarti bahwa plasmid yang ditransformasikan ke dalam sel kompeten bakteri merupakan plasmid rekombinan atau dengan kata lain gen *OsERA1* telah berhasil disisipkan ke plasmid kloning *pGEM®-T Easy*. Ke-



**Gambar 1.** Isolasi dan karakterisasi sekuen gen *ERA1* dari tanaman padi. (A) Produk amplifikasi PCR berukuran 1.450 bp menggunakan primer spesifik gen *ERA1* dengan cetakan cDNA. Lajur 1 = Inpari 1, lajur 2 = Nipponbare. M = marka 1 Kb plus (Invitrogen), bp = base pair/pasangan basa. (B) Hasil analisis sekuen nukleotida ampikon kandidat gen *OsERA1*.



**Gambar 2.** Kloning gen *OsERA1* ke vektor ekspresi pCambia1301. (A) Koloni-koloni tunggal bakteri *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  pada media LB padat hasil transformasi bakteri dengan plasmid rekombinan pGEM-T/*OsERA1*. (B) Produk amplifikasi PCR gen *OsERA1* dari koloni tunggal bakteri hasil transformasi dengan plasmid pGEM-T/*OsERA1*. Lajur 1–8 = sampel koloni bakteri *E. coli* DH5 $\alpha$  yang diambil dari populasi koloni bakteri pada LB padat. M = marka 1 Kb plus (Invitrogen). (C) Hasil pemotongan plasmid rekombinan pCambia1301-*OsERA1* dengan enzim restriksi *Bam*HI dan *Sal*I berupa dua fragmen DNA masing-masing adalah vektor pCambia1301 (11.849 bp) dan gen *OsERA1* (1.450 bp). (D) Peta plasmid pCambia1301-*OsERA1* atau pC-*OsERA1*.

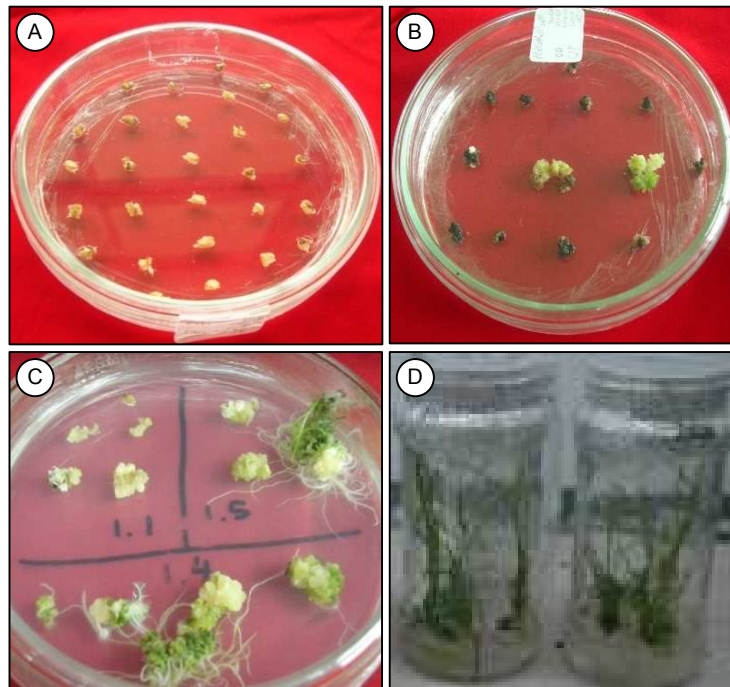
untungan penyisipan fragmen gen *OsERA1* ke plasmid kloning seperti *pGEM®-T Easy* adalah fragmen gen hasil isolasi dapat disimpan dan diperbanyak untuk penelitian manipulasi gen selanjutnya tanpa harus mengisolasi kembali dari jaringan tanaman.

Subkloning fragmen gen *OsERA1* ke vektor ekspresi pCambia1301 dengan bantuan enzim ligase telah menghasilkan kaset konstruk pCambia1301-*OsERA1*. Indikasi keberhasilan subkloning dibuktikan dengan proses validasi melalui pemotongan plasmid kaset konstruk dengan dua enzim restriksi, yaitu *Bam*HI dan *Sal*I. Pemotongan plasmid konstruk pCambia1301-*OsERA1* menghasilkan dua fragmen DNA, yaitu fragmen berukuran 11.849 bp (vektor pCambia1301) dan 1.450 bp (gen *OsERA1*) (Gambar 2C). Kaset konstruk pCambia1301-*OsERA1*, selain membawa gen *OsERA1*, juga membawa marka gen antibiotik *hptII* untuk menyeleksi tanaman hasil transformasi (Gambar 2D). Pada kaset konstruk ini, gen *OsERA1* dikendalikan dengan promotor konstitutif 35S *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) dan terminator 35S CaMV. Wang et al. (2005) menggunakan promotor yang diinduksi oleh kekeringan (*drought-inducible promoter*) Rd29 untuk mempelajari fungsi gen *ERA1* pada *Brassica napus* transgenik. Pengguna-

an promotor inducibel sebenarnya lebih menguntungkan karena gen target hanya akan diekspresikan ketika terjadi cekaman kekeringan sehingga tanaman tidak banyak kehilangan energi dibanding dengan promotor konstitutif yang mengekspresikan gen secara terus menerus pada kondisi tercekam atau tidak. Namun, karena plasmid vektor yang mengandung promotor inducible tidak tersedia, pada penelitian ini digunakan vektor kaset dengan promotor konstitutif 35S CaMV.

### Introduksi Gen *OsERA1* ke dalam Genom Padi Model Nipponbare Menggunakan *A. tumefaciens*

Transformasi genetik padi cv. Nipponbare dengan bantuan bakteri *A. tumefaciens* menggunakan sebanyak 880 eksplan embrio muda (Gambar 3A) telah menghasilkan 194 kalus yang tahan terhadap agen seleksi higromisin. Kalus yang tahan antibiotik higromisin merupakan kalus-kalus transforman yang ditandai dengan kemampuan kalus untuk berproliferasi pada media seleksi tersebut (Gambar 3B). Dari kalus-kalus yang tahan, hanya sebanyak delapan belas kalus yang berhasil diregenerasikan menjadi tunas (Gambar 3C). Tunas yang dihasilkan pada media regenerasi telah ditumbuhkan pada media



**Gambar 3.** Transformasi genetik padi model Nipponbare dengan gen *OsERA1* menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens*. (A) Seleksi kalus I pada media seleksi yang mengandung antibiotik higromisin 30 mg/l. (B) Kalus-kalus padi yang hidup pada media seleksi menunjukkan kemampuan untuk beregenerasi. (C) Kalus-kalus padi hasil transformasi beregenerasi membentuk tunas. (D) Tunas-tunas padi transforman membentuk akar pada media perakaran.

perakaran dan menghasilkan tanaman padi transgenik yang lengkap dengan akar dan daun (Gambar 3D). Pada tahap aklimatisasi, tanaman yang masih bertahan hidup hanya tersisa sembilan galur tanaman transgenik putatif dikarenakan faktor kegagalan dalam beradaptasi di rumah kaca.

Efisiensi transformasi pada penelitian ini masih tergolong rendah, yaitu sekitar 1% karena dari sekitar 880 eksplan hanya menghasilkan sembilan tanaman transforman. Rendahnya galur transforman padi yang diperoleh mungkin disebabkan oleh faktor *escape* kalus-kalus pada awal tahap seleksi awal, namun akhirnya kalus-kalus tersebut terseleksi pada tahap seleksi lanjut dan regenerasi. Faktor lain yang mungkin juga berpengaruh terhadap rendahnya galur transforman adalah masih tingginya konsentrasi agen seleksi higromisin. Kepekaan terhadap konsentrasi higromisin di antara genotipe tanaman mungkin berbeda-beda. Tran dan Sanan-Mishra (2015) melaporkan bahwa efektivitas seleksi dengan antibiotik bergantung pada banyak faktor, seperti spesies tanaman, kultivar, jenis jaringan, dan perbedaan tahapan perkembangan tanaman pada spesies tanaman yang sama. Penggunaan gen *hptII* untuk marka seleksi pada transformasi genetik tanaman telah banyak dilaporkan (Hiei dan Komari 2008; Ishizaki dan Kumashiro 2008; Htwe et al. 2014) dan marka seleksi

ini cukup efektif untuk menyeleksi tanaman transforman. Meskipun demikian, higromisin juga dapat memberikan pengaruh negatif pada perkembangan, ukuran, dan warna kalus yang diseleksi apabila konsentrasinya tidak tepat (Tran dan Sanan-Mishra 2015). Galur-galur tanaman padi transgenik putatif Nipponbare yang diperoleh digunakan sebagai materi pada analisis genotipik dan fenotipik fungsi gen kandidat *OsERA1* terhadap kekeringan.

#### Analisis Molekuler Tanaman Transforman Padi Nipponbare-*OsERA1*

##### Analisis molekuler dengan teknik PCR

Hasil analisis PCR dengan primer *hptII* pada 9 galur (45 tanaman) transgenik putatif menunjukkan bahwa 7 galur (31 tanaman) transforman positif mengandung gen *hptII* yang ditunjukkan dengan dihasilkannya pita DNA berukuran 500 bp (Gambar 4A). Jumlah tanaman yang positif PCR dari tiap galur transforman berkisar antara 2–9 tanaman (Tabel 1). Penggunaan primer gen *hptII*, di samping untuk skrining awal tanaman transgenik, juga untuk menghindari adanya *false* positif. Gen *OsERA1* diisolasi dari tanaman padi sehingga apabila integrasi gen dideteksi menggunakan primer spesifik gen *OsERA1*, tanaman kontrol juga akan menghasilkan pita DNA. Salah satu strategi yang digunakan untuk mendeteksi



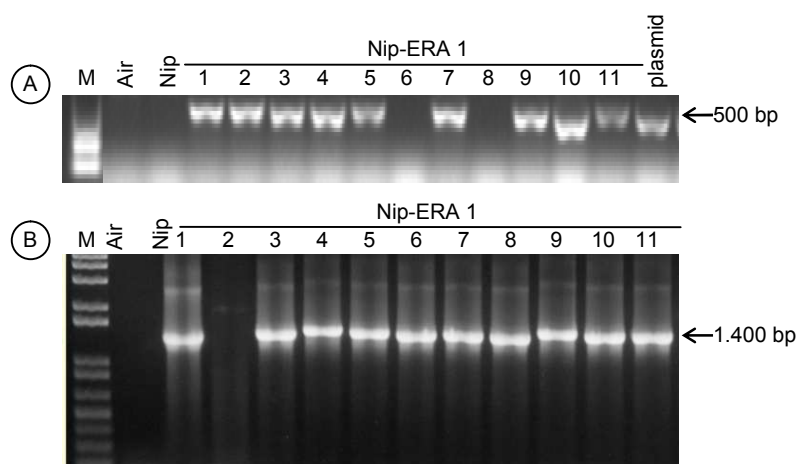
integrasi transgen adalah menggunakan primer kombinasi spesifik, yaitu primer *forward* pada bagian promotor dan primer *reverse* pada bagian gen.

Hasil analisis molekuler dengan primer spesifik menunjukkan bahwa galur yang mengandung gen *hptII* juga positif mengandung gen *OsERA1*. Sebagai contoh, galur Nipponbare-*OsERA1* yang menghasilkan sembilan tanaman positif mengandung transgen menggunakan primer gen *hptII* dan primer kombinasi dari gen *hptII* dan *OsERA1* (Gambar 4B). Penggunaan primer spesifik dapat menjamin bahwa tanaman transforman yang diperoleh benar-benar merupakan tanaman transgenik (*true transgenic plant*). Deteksi transgen dengan primer spesifik ini merupakan tahapan yang selalu ada di dalam perakitan tanaman transgenik (Melloul et al. 2014; Lu et al. 2016; Dong et al. 2017).

#### Analisis molekuler dengan hibridisasi *Southern blot*

Hasil analisis *Southern blot* pada dua galur padi transgenik generasi T<sub>2</sub> (16 tanaman), yaitu Nip-ERA 6

(6 tanaman) dan Nip-ERA 18 (Nip-ERA 18.2 sebanyak 6 tanaman, Nip-ERA 18.5 sebanyak 2 tanaman, dan Nip-ERA 18.8 sebanyak 2 tanaman) menunjukkan bahwa integrasi transgen pada tanaman padi transgenik terjadi dengan jumlah salinan transgen berkisar antara 1–3 kopi. Namun, beberapa tanaman tidak terdeteksi jumlah salinan transgennya (Tabel 2, Gambar 5). Terdapat 5 tanaman padi transgenik yang mempunyai salinan transgen 1 kopi, yaitu 2 tanaman dari galur Nip-ERA 6 (Nip-ERA 6.4.2 dan Nip-ERA 6.4.3) dan 3 tanaman dari galur Nip-ERA 18 (Nip-ERA 18.2.13, Nip-ERA 18.2.15, dan Nip-ERA 18.8.5). Tanaman transgenik dengan integrasi transgen 1 kopi pada umumnya memiliki kestabilan genetik yang lebih baik dibanding dengan jumlah kopi transgen yang lebih dari 1 kopi karena peluang terjadinya *gene silencing* kecil. Adanya tanaman yang tidak terdeteksi jumlah kopi transgen setelah analisis hibridisasi *Southern blot* sepertinya lebih dikarenakan konsentrasi DNA yang terlalu rendah akibat tidak tertransfer secara sempurna sewaktu tahapan *blotting*.



**Gambar 4.** Analisis PCR pada galur transgenik Nipponbare-*OsERA1* (Nip-ERA 1) menggunakan primer spesifik gen *hptII*. (A) Sembilan tanaman positif mengandung gen *hptII* (500 bp). (B) Sembilan tanaman positif PCR dengan primer kombinasi dari gen *hptII* dan *OsERA1*, F-35S dan R-*OsERA1*, tanpa dua tanaman negatif *hptII* (tanaman no. 6 dan 8 tidak diikutkan). Nip = Nipponbare.

**Tabel 1.** Jumlah tanaman transgenik Nipponbare-*OsERA1* generasi T<sub>1</sub> yang diperoleh setelah di analisis menggunakan teknik PCR dengan primer gen *hptII*.

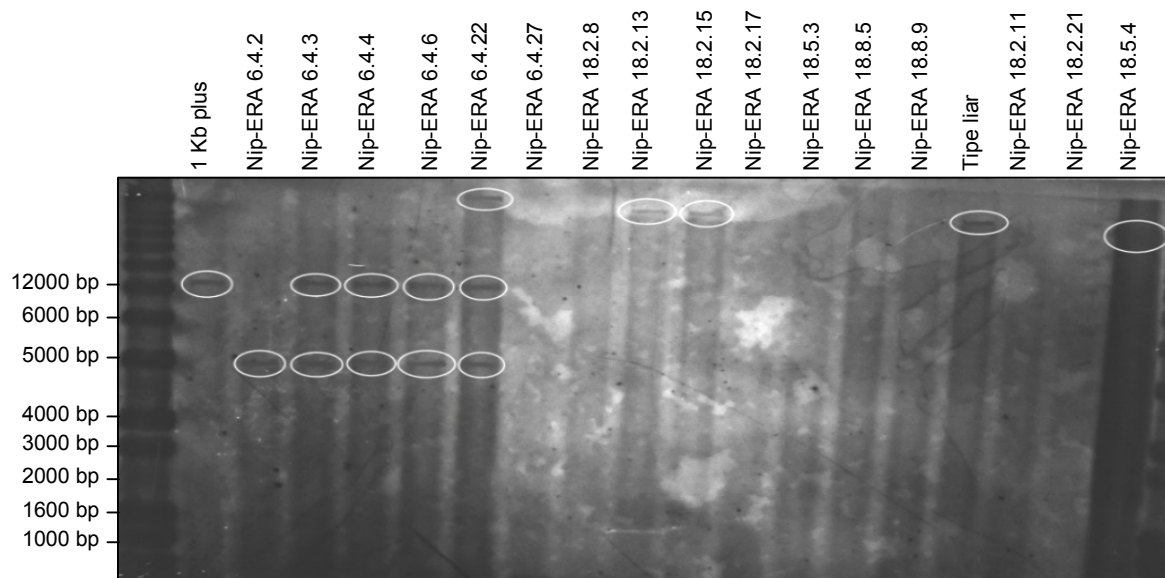
Galur transgenik	Jumlah tanaman	Jumlah tanaman positif PCR	Tanaman positif PCR (%)
Nip-ERA 1	11	9	81,8
Nip-ERA 5	2	2	100,0
Nip-ERA 6	4	4	100,0
Nip-ERA 7	3	2	66,7
Nip-ERA 8	3	0	0,0
Nip-ERA 9	1	0	0,0
Nip-ERA 10	5	5	100,0
Nip-ERA 11	7	3	42,9
Nip-ERA 18	9	6	66,7



### Respon Padi Transgenik Nipponbare-*OsERA1* terhadap Cekaman Kekeringan pada Fase Vegetatif

Hasil uji cekaman kekeringan pada fase vegetatif menunjukkan lima galur transgenik Nipponbare-*OsERA1* mempunyai kemampuan pemulihan (*recovery*) setelah perlakuan cekaman kekeringan dibanding dengan tanaman kontrol nontransgenik (Gambar 6, Tabel 3). Semua galur transgenik dan kontrol nontransgenik menunjukkan fenotipe penggulungan daun hingga skor 9 (daun menggulung ketat). Namun demikian, untuk kondisi daun menge-

ring, tanaman transgenik Nipponbare-*OsERA1* menunjukkan skor daun mengering dengan kisaran 3–7, sementara tanaman kontrol Nipponbare mengalami kekeringan daun sempurna dengan skor 9 (tanaman mati). Setelah periode perlakuan cekaman kekeringan, galur-galur transgenik Nipponbare-*OsERA1* menunjukkan adanya kemampuan pulih dengan skor pemulihan 1, sementara tanaman kontrol Nipponbare nontransgenik tidak mampu untuk pulih yang ditunjukkan oleh fenotipe daun tanaman tetap menggulung dan mengering yang selanjutnya mati (Tabel 3).



**Gambar 5.** Hasil analisis jumlah kopi transgen menggunakan teknik hibridisasi *Southern blot* pada enam belas tanaman dari dua galur padi transgenik Nipponbare-*OsERA1* (Nip-ERA 6 dan Nip-ERA 18) generasi  $T_2$  menggunakan pelacak gen *hptII*.

**Tabel 2.** Hasil analisis molekuler dan pola integrasi gen sisipan (*OsERA1*) pada enam belas tanaman padi transgenik Nipponbare-*OsERA1* generasi  $T_2$  menggunakan primer spesifik gen *hptII* pada analisis PCR dan pelacak gen *hptII* pada analisis *Southern blot*.

Genotipe padi transgenik putatif	Hasil analisis PCR	Jumlah salinan gen hasil analisis <i>Southern blot</i>
Nipponbare	–	–
Nip-ERA 6.4.2	+	1
Nip-ERA 6.4.3	+	1
Nip-ERA 6.4.4	+	2
Nip-ERA 6.4.6	+	2
Nip-ERA 6.4.22	+	2
Nip-ERA 6.4.27	+	3
Nip-ERA 18.2.8	+	nd
Nip-ERA 18.2.11	+	nd
Nip-ERA 18.2.13	+	1
Nip-ERA 18.2.15	+	1
Nip-ERA 18.2.17	+	nd
Nip-ERA 18.2.21	+	nd
Nip-ERA 18.5.3	+	nd
Nip-ERA 18.5.4	+	nd
Nip-ERA 18.8.5	+	1
Nip-ERA 18.8.9	+	nd

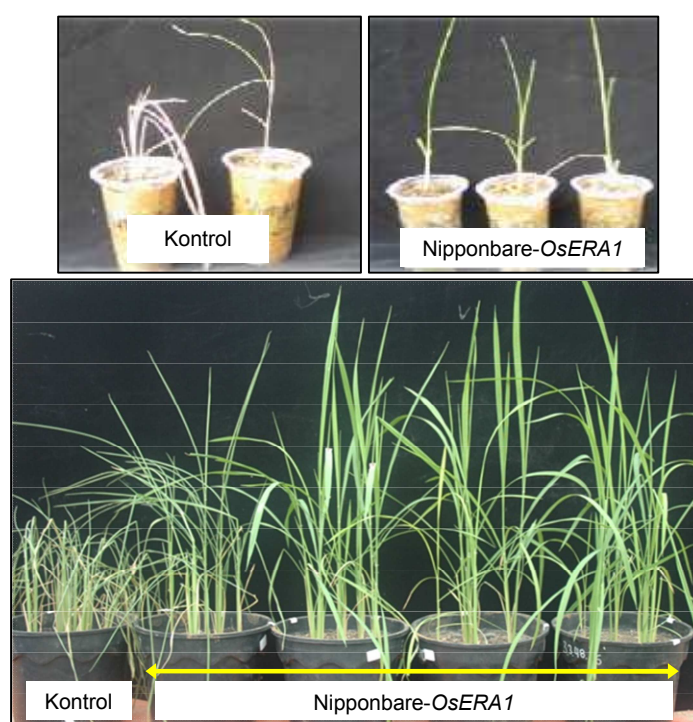
+ = terdapat pita gen target, – = pita gen target tidak muncul, nd = jumlah kopi transgen tidak dapat ditentukan.

### Respon Padi Transgenik Nipponbare-*OsERA1* terhadap Cekaman Kekeringan pada Fase Generatif

Hasil pengujian toleransi kekeringan pada fase generatif menunjukkan bahwa galur-galur padi transgenik Nipponbare-*OsERA1* memberikan respon yang lebih baik dibanding dengan tanaman kontrol Nipponbare. Hal ini ditunjukkan oleh keragaan galur-galur padi transgenik Nipponbare-*OsERA1* yang masih mampu untuk tumbuh normal setelah cekaman kekeringan dan menghasilkan biji normal (Gambar 7). Di samping itu, tanaman padi transgenik Nipponbare-*OsERA1* menghasilkan jumlah biji total per rumpun lebih tinggi dan jumlah biji hampa lebih rendah dibanding dengan tanaman kontrol Nipponbare.

Namun demikian, keragaan galur padi transgenik Nipponbare-*OsERA1* untuk karakter jumlah biji total per rumpun dan jumlah biji hampa masih lebih rendah daripada Nipponbare tanpa perlakuan. Hal ini menandakan bahwa perlakuan cekaman kekeringan itu sendiri masih memberikan pengaruh terhadap penurunan jumlah biji total dan jumlah biji hampa (Gambar 8 dan 9). Respon positif pada galur-galur tanaman padi transgenik Nip-ERA 1 pada cekaman kekeringan, baik pada fase vegetatif maupun generatif, menunjukkan bahwa gen *OsERA1* tersebut telah berfungsi pada galur-galur transgenik yang dihasilkan.

Respon tanaman padi terhadap kekeringan diawali dengan adanya respon secara fisiologis yang kemudian diikuti oleh perubahan secara morfologis,



**Gambar 6.** Keragaan tanaman padi transgenik Nipponbare-*OsERA1* dan Nipponbare kontrol generasi  $T_1$  setelah perlakuan cekaman kekeringan.

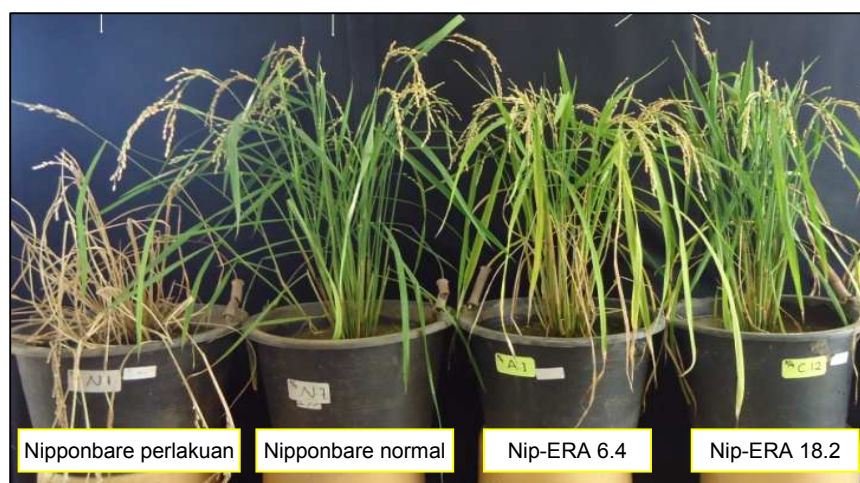
**Tabel 3.** Skor hasil pengujian daun menggulung, daun mengering, dan skor pemulihan tanaman padi transgenik Nipponbare-*OsERA1* dan Nipponbare kontrol setelah perlakuan cekaman kekeringan pada fase vegetatif.

Genotipe	Jumlah tanaman yang dianalisis	Uji cekaman kekeringan pada fase vegetatif		Skor pemulihan*
		Skor daun menggulung	Skor daun mengering	
Nipponbare	5	9	9	9
Nip-ERA 6.4	18	9	3–7	1
Nip-ERA 11.7	2	9	7	1
Nip-ERA 18.2	8	9	3–7	1
Nip-ERA 18.5	11	9	5–7	1
Nip-ERA 18.8	4	9	7	1

\*Skor pemulihan setelah perlakuan cekaman kekeringan: 1 = 90–100% tanaman pulih, 3 = 70–89% tanaman pulih, 5 = 40–69% tanaman pulih, 7 = 20–39% tanaman pulih, 9 = 0–19% tanaman pulih.

baik sebagai mekanisme toleransi tanaman maupun dampak dari proses akibat cekaman kekeringan. Perubahan morfologis juga berdampak terhadap perubahan proses fisiologis lanjutan sehingga terjadi saling pengaruh antar keduanya. Perubahan-perubahan tersebut diekspresikan oleh tanaman dalam bentuk pola pertumbuhan yang berpengaruh terhadap bobot biomassa, hasil, dan komponen hasil tanaman (Sujinah dan Jamil 2016). Pada fase vegetatif, galur-galur padi transgenik Nipponbare-*OsERA1* menunjukkan kepulihannya yang lebih baik dibanding dengan tanaman kontrol. Respon ini mungkin berkaitan dengan kemampuan tanaman dalam pengurangan laju transpirasi untuk menghemat air pada galur-galur transgenik tersebut. Pengurangan laju transpirasi diduga karena adanya peran gen *OsERA1* eksogenus untuk meningkatkan sensitivitas sel penjaga pada stomata terhadap ABA. Menurut Fischer et al. (2003), mekanisme yang dapat memperlambat laju transpirasi adalah dengan cara menutup stomata dan memperkecil luas permukaan daun dengan menggulung daun.

Pada fase generatif, perlakuan cekaman kekeringan memengaruhi proses fisiologis dan morfologis tanaman padi transgenik Nipponbare-*OsERA1*. Galur-galur padi transgenik mempunyai respon yang lebih baik pada salah satu karakter agronomis, yaitu jumlah biji total per rumpun dan persentase jumlah biji hampa. Perlakuan cekaman kekeringan menyebabkan penurunan laju fotosintesis yang signifikan, terutama pada fase generatif. Kekeringan yang terjadi pada fase inisiasi malai menurunkan volume fotosintesis sebesar 30,69% dan pada fase antesis sebesar 28%, seperti yang dilaporkan oleh Akram et al. (2013). Selain itu, kekeringan pada fase inisiasi malai menyebabkan terganggunya proses biokimia, fisiologis, dan penurunan aktivitas enzimatis dan degradasi pigmen klorofil. Mostajeran dan Rahimi-Eichi (2009) melaporkan bahwa pada fase generatif, hasil fotosintesis banyak diarahkan ke bagian generatif, yaitu malai dan gabah. Cekaman kekeringan yang terjadi pada fase generatif akan mengganggu inisiasi pengisian biji yang menyebabkan spikelet steril dan gabah hampa.

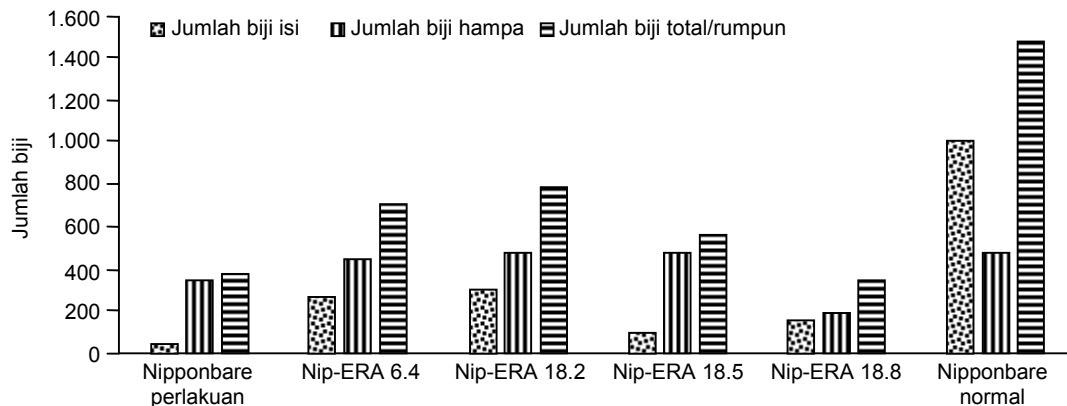


**Gambar 7.** Keragaan tanaman padi transgenik Nipponbare-*OsERA1* dan Nipponbare kontrol pada pengujian cekaman kekeringan pada fase generatif. Nipponbare perlakuan = galur padi Nipponbare nontransgenik dengan perlakuan cekaman kekeringan, Nipponbare normal = galur padi Nipponbare nontransgenik tanpa perlakuan cekaman kekeringan (normal), Nip-ERA 6.4 dan Nip-ERA 18.2 = galur padi Nipponbare transgenik dengan perlakuan cekaman kekeringan.

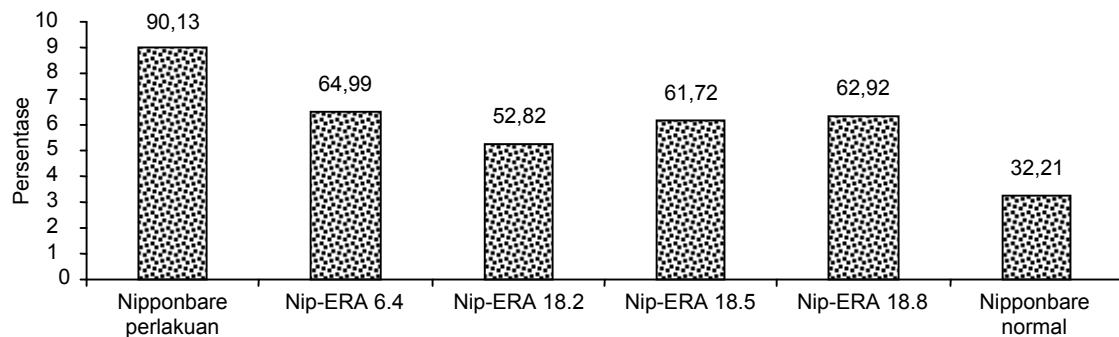
**Tabel 3.** Skor hasil pengujian daun menggulung, daun mengering, dan skor pemulihan tanaman padi transgenik Nipponbare-*OsERA1* dan Nipponbare kontrol setelah perlakuan cekaman kekeringan pada fase vegetatif.

Genotipe	Jumlah tanaman yang dianalisis	Uji cekaman kekeringan pada fase vegetatif		Skor pemulihan*
		Skor daun menggulung	Skor daun mengering	
Nipponbare	5	9	9	9
Nip-ERA 6.4	18	9	3–7	1
Nip-ERA 11.7	2	9	7	1
Nip-ERA 18.2	8	9	3–7	1
Nip-ERA 18.5	11	9	5–7	1
Nip-ERA 18.8	4	9	7	1

\*Skor pemulihan setelah perlakuan cekaman kekeringan: 1 = 90–100% tanaman pulih, 3 = 70–89% tanaman pulih, 5 = 40–69% tanaman pulih, 7 = 20–39% tanaman pulih, 9 = 0–19% tanaman pulih.



**Gambar 8.** Jumlah biji galur padi transgenik Nipponbare-*OsERA1* setelah perlakuan cekaman kekeringan dibanding dengan kontrol.



**Gambar 9.** Persentase jumlah biji hampa galur padi transgenik Nipponbare-*OsERA1* setelah perlakuan cekaman kekeringan dibanding dengan kontrol.

Galur-galur transgenik Nipponbare-*OsERA1* mempunyai respon yang lebih baik pada fase generatif diduga karena galur-galur tersebut mengurangi laju transpirasi melalui mekanisme peningkatan aktivitas meristem dan pengurangan intensitas pembukaan stomata oleh peran gen *ERA1* (Pei et al. 1998). Wang et al. (2005) melaporkan bahwa tanaman kanola transgenik yang membawa transgen *antisense ERA1* menunjukkan peningkatan sensitivitas terhadap ABA dan secara nyata menurunkan pembukaan stomata dan transpirasi pada saat cekaman kekeringan.

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa galur-galur transgenik yang membawa transgen *OsERA1* mempunyai respon toleransi terhadap kekeringan yang meningkat dibanding dengan Nipponbare kontrol, baik pada fase vegetatif maupun generatif. Respon toleran kekeringan dengan periode kekeringan selama 7 hari atau lebih yang dimiliki oleh galur-galur transgenik Nipponbare-*OsERA1* merupakan aspek penting dalam perakitan tanaman toleran kekeringan. Toleransi kekeringan yang diinduksi oleh ekspresi gen *OsERA1* dapat membantu dalam menekan kehilangan hasil padi selama periode terjadinya cekaman kekeringan. Penelitian untuk mempelajari gen-gen terkait toleran kekeringan se-

lain gen *OsERA1* juga telah dilakukan, seperti gen *OsNAC10* (akronim dari *NO APICAL MERISTEM* [NAM], *ATAF1-2*, dan *CUP-SHAPED COTYLEDON 2* [CUC2]) (Jeong et al. 2010), gen *Pyrabactin resistance 1-like 5* (*PYL5*) (Kim et al. 2014), dan *OsGRAS* (*Gibberellic-Acid Insensitive* [GAI], *REPRESSOR OF ga1-3* [RGA], dan *SCARECROW* [SCR]) (Xu et al. 2015).

## KESIMPULAN

Gen *OsERA1* telah berhasil dikonstruksi ke dalam kaset vektor transformasi pCambia1301 dengan dikendalikan oleh promotor dan terminator 35S CaMV. Kaset vektor transformasi pCambia1301-*OsERA1* telah diintroduksi ke dalam genom padi cv. Nipponbare dan menghasilkan sembilan galur tanaman transgenik putatif independen generasi  $T_0$ . Analisis PCR sembilan galur tanaman transgenik putatif generasi  $T_1$  menggunakan primer spesifik menunjukkan bahwa tujuh galur tanaman telah terdeteksi membawa transgen *OsERA1*. Analisis *Southern blot* pada dua galur padi transgenik generasi  $T_2$ , yaitu Nip-ERA 6 (6 tanaman) dan Nip-ERA 18 (10 tanaman) menunjukkan gen *OsERA1* terintegrasi dengan jumlah kopi sisipan transgen bervariasi antara 1–3 kopi.

Lima galur padi transgenik Nipponbare-*OsERA1* generasi T<sub>1</sub> mempunyai respon toleransi yang lebih baik terhadap cekaman kekeringan pada fase vegetatif dibanding dengan Nipponbare kontrol dalam hal kemampuan pulih setelah perlakuan cekaman kekeringan. Pada fase generatif, lima galur padi transgenik Nipponbare-*OsERA1* generasi T<sub>2</sub> menghasilkan jumlah biji hampa yang lebih sedikit dibanding dengan kontrol setelah perlakuan cekaman kekeringan.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai melalui anggaran DIPA BB Biogen, Balitbangtan, Kementan. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Nuryati atas bantuannya dalam pelaksanaan penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Akram, H., Ali, M.A., Sattar, A., Rehman, H.S.U. & Bibi, A. (2013) Impact of water deficit stress on various physiological and agronomic traits of three Basmati rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 23 (5), 1415–1423.
- Allen, G.J., Murata, Y., Chu, S.P., Nafiei, M. & Schroeder, J.I. (2002) Hypersensitivity of abscisic acid-induced cytosolic calcium increases in the *Arabidopsis* farnesyltransferase mutant *era1-2*. *The Plant Cell*, 14 (7), 1649–1662.
- Cutler, S., Ghassemaian, M., Bonetta, D., Cooney, S. & McCourt, P. (1996) A protein farnesyltransferase involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Science*, 273 (5279), 1239–1241.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. & Hicks, J.B. (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1 (4), 19–21.
- Dong, Y., Jin, X., Tang, Q., Zhang, X., Yang, J., Liu, X., Cai, J., Zhang, X., Wang, X. & Wang, Z. (2017) Development and event-specific detection of transgenic glyphosate-resistant rice expressing the *G2-EPSPS* gene. *Frontiers in Plant Science*, 8, 885. doi: 10.3389/fpls.2017.00885.
- Fischer, K.S., Lafitte, R., Fukai, S., Atlin, G. & Hardy, B. (2003) *Breeding rice for drought prone environments*. International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.
- Hiei, Y. & Komari, T. (2008) *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. *Nature Protocols*, 3 (5), 824–834.
- Htwe, N.N., Ling, H.C., Zaman, F.Q. & Maziah, M. (2014) Plant genetic transformation efficiency of selected Malaysian rice based on selectable marker gene (*hptII*). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 17 (4), 472–481.
- IRRI (1996) *Standard evaluation system for rice*. 4th ed. IRTP, International Rice Research Institute. Los Baños, The Philippines. 54 p.
- Ishizaki, T. & Kumashiro, T. (2008) Genetic transformation of NERICA, interspecific hybrid rice between *Oryza glaberrima* and *O. sativa*, mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 27 (2), 319–327.
- Jeong, J.S., Kim, Y.S., Baek, K.H., Jung, H., Ha, S.H., Choi, Y.D., Kim, M., Reuzeau, C. & Kim, J.K. (2010) Root-specific expression of *OsNAC10* improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. *Plant Physiology*, 153 (1), 185–197.
- Kim, H., Lee, K., Hwang, H., Bhatnagar, N., Kim, D.Y., Yoon, I.S., Byun, M.O., Kim, S.T., Jung, K.H. & Kim, B.G. (2014) Overexpression of *PYL5* in rice enhances drought tolerance, inhibits growth, and modulates gene expression. *Journal of Experimental Botany*, 65 (2), 453–464.
- Lu, J., Ji, G.Z., Li, G., Wu, Y.F., Yang, J., Lin, S.L., Yang, D.L., Zhao, J.N. & Xiu, W.M. (2016) Development of a multiplex event-specific PCR assay for detection of genetically modified rice. *Cereal Research Communications*, 44 (1), 47–56.
- Melloul, M., Iraqi, D., Udupa, S.M., El Alaoui, M.A., Alaoui, S.A., Ibriz, M. & Elfahima, E. (2014) Development of specific primers for the detection of *HVA1* from barley in transgenic durum wheat by polymerase chain reaction (PCR) technology. *African Journal of Biotechnology*, 13 (4), 581–592.
- Mostajeran, A. & Rahimi-Eichi, V. (2009) Effects of drought stress on growth and yield of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars and accumulation of proline and soluble sugars in sheath and blades of their different ages leaves. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 5 (4), 264–272.
- Oh, S., Song, S.I., Kim, Y.S., Jang, H.J., Kim, S.Y., Kim, M., Kim, Y.K., Nahm, B.H. & Kim, J.K. (2005) *Arabidopsis* *CBF3/DREB1A* and *ABF3* in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiology*, 138, 341–351.
- Pei, Z.M., Ghassemian, M., Kwak, C.M., McCourt, P. & Schroeder, J.I. (1998) Role of farnesyltransferase in ABA regulation of guard cell anion channels and plant water loss. *Science*, 282 (5387), 287–290.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sujinah & Jamil, A. (2016) Mekanisme respon tanaman padi terhadap cekaman kekeringan dan varietas toleran. *Iptek dan Tanaman Pangan*, 11 (1), 1–7.
- Tao, H., Brueck, H., Dittert, K., Kreye, C., Lin, S. & Sattelmacher, B. (2006) Growth and yield formation of rice (*Oryza sativa* L.) in the water-saving ground cover rice production system (GCRPS). *Field Crops Research*, 95 (1), 1–12.

- Tran, T.N. & Sanan-Mishra, N. (2015) Effect of antibiotics on callus regeneration during transformation of IR 64 rice. *Biotechnology Reports*, 7, 143–149.
- Trijatmiko, K.R., Arines, F.M., Olivia, N., Slamet-Loedin, I.H. & Kohli, A. (2016) Molecular analyses of transgenic plants. In: MacDonald, J., Kolotilin, I. & Menassa, R. (eds.) *Recombinant proteins from plants*. Methods in Molecular Biology, vol. 1385. New York, NY, Humana Press. pp. 201–222.
- Wang, Y., Ying, J., Kuzma, M., Chalifoux, M., Sample, A., McArthur, C., Uchaz, T., Sarvas, C., Wan, J., Dennis, D.T., McCourt, P. & Huang, Y. (2005) Molecular tailoring of farnesylation for plant drought tolerance and yield protection. *Plant Journal*, 43 (3), 413–424.
- Xu, K., Chen, S., Li, T., Ma, X., Liang, X., Ding, X., Liu, H. & Luo, L. (2015) OsGRAS23, a rice GRAS transcription factor gene, is involved in drought stress response through regulating expression of stress-responsive genes. *BMC Plant Biology*, 15 (1), 1–13. doi: 10.1186/s12870-015-0532-3.
- Ziegelhoffer, E.C., Medrano, L.J. & Meyerowitz, E.M. (2000) Cloning of the *Arabidopsis* WIGGUM gene identifies a role for farnesylation in meristem development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (13), 7633–7638.
-